

In-Source Decay によるオリゴDNAのシーケンス解析

Oligo-DNA Sequencing Using In-Source Decay

DNA塩基配列の決定には、サンガー法を基本原理とする手法が汎用されていますが、この手法ではプライマーの塩基数に近い短鎖DNAの配列解析は出来ません。

一方、最近短いオリゴDNA (30 mer程度以下) の塩基配列決定に、MALDI-TOF MSが応用され始めています。この方法では断片化したオリゴDNAの質量スペクトルを取得し、ピーク間の質量差から配列を解読します。これまで、イオン化したオリゴDNAを不活性ガスと衝突させる気相分解法や、酵素消化・化学分解によりDNAの断片化を行い、その質量スペクトルを得る手法などが検討されてきました。

ここで紹介するIn-Source Decay (ISD) は、MALDI-TOF MSのイオン源内で起こるイオンの解裂であり、主にタンパク質やペプチドのアミノ酸配列解析に利用されています。

この方法で用いる1,5-Diaminonaphthalene (DAN) は、

ISDを効率よく引き起こすマトリックスとして報告されました (参考1,2)。

本稿では、オリゴDNAの断片化に対するDANの効果を検証しました。DANだけではオリゴDNAのISDが生じませんでしたが、DNA検出用として汎用されている2,4-Dihydroxyacetophenone (DHAP) とDANの混合物をマトリックスとして使用することで、ISDによるフラグメントイオンを検出できました (Fig. 1)。ISDにより生じたイオンは理論質量よりも数Da大きい値で検出されました。ISDによる解裂に要するナノ秒単位の時間が質量誤差の原因と推察しています。この誤差を補正するため、チミジンの70量体のISDで生じたイオンを質量校正に用いています (データ未掲載)。このため、ISDで生じたイオンではないオリゴDNAの質量は、理論値 (m/z 9111) より大きく検出されました。

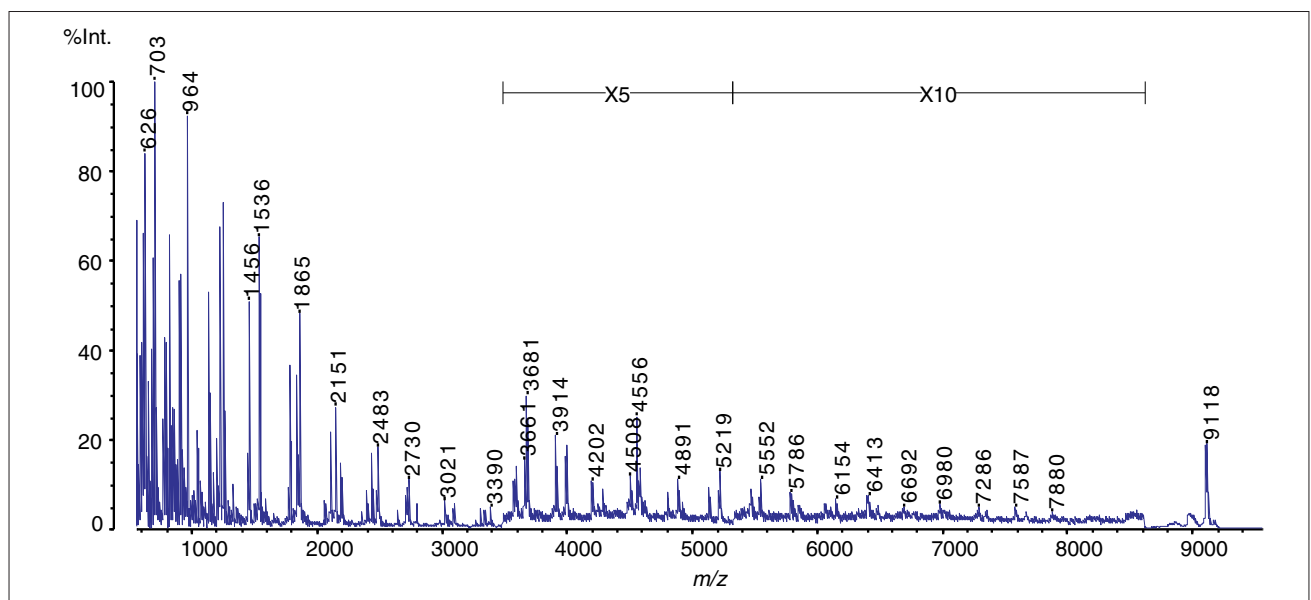


Fig. 1 オリゴDNA (30 mer) のISDプロファイル (m/z 550-9500)
ISD Profile of Oligo-DNA 30 mer (m/z 550-9500)

■測定条件

Measurement Condition

装置：AXIMA Performance

測定条件：Negative/linear mode

試料：Oligo DNA 30 mer 5'-GATCCTTCCGAGGTTACCTACGGAAACC-3' (SIGMA)

マトリックス：DHAPとDAN 共に5 mg/mL (50% アセトニトリル)

Fig. 1 の質量スペクトルについて m/z 550~4400の拡大図をFig. 2上に、 m/z 4150~8000の拡大図をFig. 2下に示しました。各ピークの帰属を行なった結果、主にw, y, dの系列のイオン(命名法: Fig. 2右下)が帰属されました。y系列の帰属から、5'末端の3残基目から20残基目までのy13を除く全てのイオンが帰属され、w系列の帰属から3'末端の4残基目から26残基目まで全てのイオンが帰属されました。

RNAについても同様の塩基配列解析が期待されますが、DNAのISDと同じ条件においては、RNAのISDによるフラグメントイオンはほとんど検出されませんでした。RNAの塩基配列決定法については、酸加水分解による断片化と質量スペクトルを取得する手法が最近報告されています(参考3)。

M. Yamada

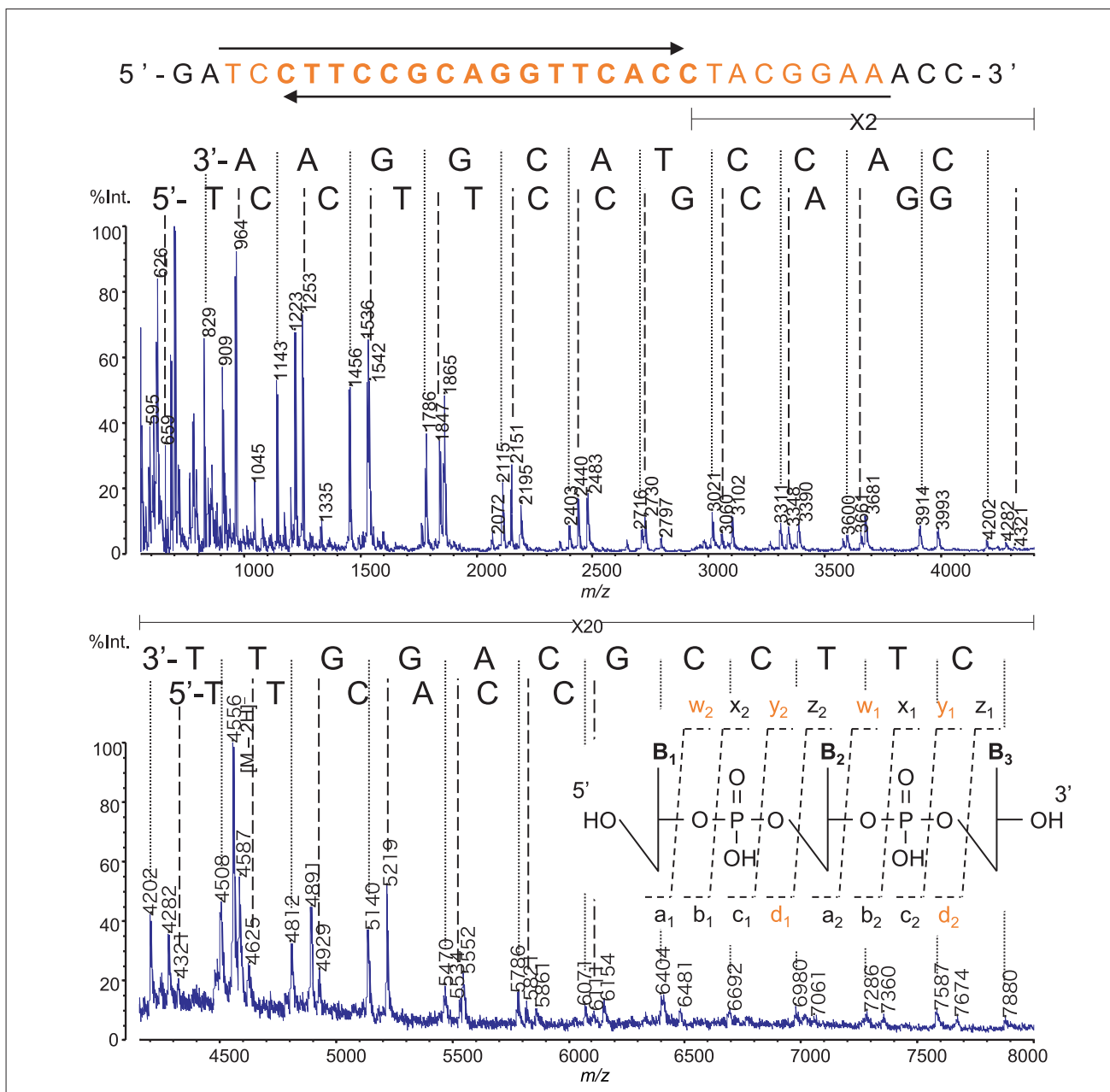


Fig. 2 オリゴDNA (30 mer) のISDプロファイル m/z 550-4400 (上段), m/z 4150-8000 (下段)
ISD Profile of Oligo-DNA (30 mer) at m/z 550-4400 (upper) and at m/z 4150-8000 (lower)

[参考文献]

- 1) Demeure, K., et al., Anal. Chem., 79, 8678-85, (2007)
- 2) Fukuyama, Y., et al., J. Mass Spectrum, 41, 191-201 (2006)
- 3) Bahr, U. et al., Anal. Chem., 81, 3173-79 (2009)

初版発行: 2009年10月

島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

☎ 0120-131691 (携帯電話不可)
● 携帯電話専用番号 (075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制Web Solutions Navigatorで閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。